Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Histamin und Serotonin in der menschlichen Rachenmandel

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Michael Christ

Saarbrücken

1972

Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität des Saarlandes (Direktor: Professor Dr. med. P. FALK)

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Histamin und Serotonin in der menschlichen Rachenmandel

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Michael Christ
geb. am 19.9.1946 in Kaiserslautern

Dekan: Professor Dr. med. H. KULENKAMPFF
Referent: Professor Dr. med. Dr. med. dent. K. MÜSEBECK

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promotionsdatum 28. 5. 1972

Meinem verstorbenen Vater gewidmet

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung	1
Literatur	3
Material und Methodik	22
Ergebnisse	26
Diskussion	33
Zusammenfassung	37
Literaturverzeichnis	38

Einleitung

Histamin und Serotonin sind Gewebshormone, über deren Chemie und Vorkommen eine umfangreiche Literatur vorliegt. Trotzdem ist man von einer befriedigenden Klärung zahlreicher Fragen noch weit entfernt. Folgende pharmakologische Wirkungen dürfen jedoch allgemein als gesichert gelten: Histamin bewirkt neben einer von der Klinik her bekannten Steigerung der Magensaftsekretion eine Erweiterung der Blutgefäße. Auch eine Beziehung zu allergischen Vorgängen ist unumstritten. Serotonin wirkt dagegen erregend auf die glatte Muskulatur. Als Angriffspunkte sind in diesem Zusammenhang vor allem die Gefäße (Vasokonstriktion) und der Magen-Darmtrakt zu nennen (Steigerung der Peristaltik bei Magen-Darmcarcinoiden).

Aufschlüsse über weitere Wirkungsweisen des Histamins und Serotonins, wie sie für das Serotonin beispielsweise in einer neuronalen Transmitterfunktion durch FALCK (1962) und BOOZ (1967) schon beschrieben sind, können auf morphologischem Gebiet nur substratspezifische, histochemische Nachweismethoden erbringen. Diese Forderung wird durch den fluoreszenzmikroskopischen Histaminnachweis nach SHELLY, ÖHMAN und PARNES (1968) sowie durch die Fluoreszenzmethode zum Nachweis biogener Monoamine (Katecholamine und Serotonin) nach FALCK und HILLARP (1963) erfüllt.

Über den Stoffwechsel des Histamins und des Serotonins in der menschlichen Rachenmandel sind nur spärliche Literaturangaben vorhanden. Histochemische Untersuchungen zur Lokalisation dieser beiden biogenen Monoamine sind an diesem Organ noch nicht durchgeführt worden. Mit Hilfe der oben angeführten fluoreszenzmikroskopischen Nachweismethoden sollen die Speicherungsorte des Histamins und Serotonins dargestellt werden.

Literatur

Die Literatur über die Mastzelle, dem für uns interessanten Speicherungsort des Histamins, hat ein kaum mehr überschaubares Ausmaß angenommen. Diese Tatsache erstaunt weniger, wenn man sich vor Augen führt, daß seit ihrer Entdeckung nun nahezu hundert Jahre vergangen sind, und die Erkenntnisse, die innerhalb dieses Zeitraums über sie gewonnen wurden, es rechtfertigen, ihr unter den Bindegewebszellen eine besondere Stellung einzuräumen.

EHRLICH beschrieb 1877 eine Zellart, deren Granula sich mit Anilinfarbstoffen metachromatisch färben ließen und die zwei Jahre zuvor noch allgemein auf Grund ihrer häufigsten Lokalisation schlicht als "perivaskuläres Zellgewebe" bezeichnet wurde. Er deutete die Granulierung als gespeicherte Nährstoffe und gab der Zelle deshalb den Namen "Mastzelle". Obwohl sich diese Annahme später als falsch erwiesen hat, ist die Bezeichnung auch heute noch allgemein gebräuchlich.

Nach Vorkommen, Genese, Morphologie und Anfärbbarkeit werden zwei Arten von Mastzellen unterschieden. Neben der etwas kleineren basophilen Blutmastzelle (BMZ), deren Kern unregelmäßig und deren Plasmasaum schmäler ist, die metachromatisch anfärbbare Gewebsmastzelle (GMZ), die einen meist runden Kern besitzt und stärker granuliert ist. Auf morphologische und

färberische Gesichtspunkte geht die derzeit am geeignetsten erscheinende Definition der GMZ von SELYE (1965), die er nach Durchsicht von 8500 Arbeiten über die Mastzelle gab, ein : "Mastzellen kommen im Bindegewebe vor und enthalten zytoplasmatische Granula, die sich unter gewöhnlichen histologischen Bedingungen metachromatisch färben".

Jahrzehntelang diskutierte man die Entstehung der Gewebsmastzellen aus undifferenzierten Fibroblasten (EHRLICH, 1879; BENSLEY, 1952), direkt aus Histiozyten und Lymphozyten (MICHELS, 1937) sowie aus Fibrozyten der Fibroblasten (GUSEK, 1960). Jüngere Beobachtungen und Versuchsergebnisse (SCHAYER, 1960; KAHLSON, 1962; SCHAUER, 1964) zeigen, daß die Mastzellen beim Foeten wahrscheinlich aus undifferenzierten mesenchymalen Bindegewebszellen entstehen, was von RILEY (1959) schon angedeutet wurde. Eine Regeneration soll aus den Kapillarmesenchymzellen, sowie durch mitotische und amitotische Teilung erfolgen (MICHELS 1937; ALLEN, 1962).

Bezüglich der Funktionen der Mastzelle gab der Nachweis der Granulainhaltsstoffe jeweils die entscheidenden Aufschlüsse. STÄMMLERs (1921) physiologische Konzeption, daß die Mastzelle als ein einzellig-drüsiges Organ des Bindegewebes zu gelten habe, wurde in der Folge durch die Identifikation des Heparins als Granulabestandteil durch JORPES, HOLMGREN und WILANDER (1937) gestützt. Daß die Mastzelle nicht nur als Heparinspeiche

im Körper angesehen werden darf, sondern selbst zur Heparinsynthese befähigt ist, bewiesen unter anderem MAGNUSSON und LARSSON (1955) sowie KORN (1959) durch den intrazellulären Einbau von S^{35}-Sulfat und C^{14}-Glukose.

Die Entdeckung einer unmittelbaren Abhängigkeit des Histamingehaltes eines Gewebes von der Mastzelldichte (RILEY u. WEST, 1953), läßt den Schluß zu, daß Histamin zumindest in der Mastzelle gespeichert wird und deutet auf eine entscheidende Mastzellfunktion hin. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Rolle des Histamins bei allergischen Vorgängen hingewiesen.

1955 gelang BENDITT, WONG, ARASE und ROEPER der Nachweis eines weiteren biogenen Amins, des Serotonins, in den Mastzellen von Ratte und Maus. Die zum Verständnis der Mastzellfunktionen wichtige Kenntnis der Granulainhaltsstoffe, warf die Frage nach dem Stoffwechsel der beiden Gewebshormone in der Mastzelle auf.

In einer Versuchsreihe zum Histaminstoffwechsel beobachtete SCHAYER (1956) die Aufnahme von C^{14} markiertem Histidin in die Mastzelle. Da ähnliche Versuche mit C^{14} markiertem Histamin fehlschlugen, und WERLE und SCHAUER (1955) zuvor schon eine Histidindecarboxylase im mastzellreichen Gewebe nachgewiesen hatten, konnte man eine intrazelluläre Histaminbildung vermuten. Heute diskutiert man zwei zur Histidindecarboxylierung befähigte

Enzyme in der Mastzelle. 1. eine Aminosäuredecarboxylase, die zwar geringe Mengen Histidin decarboxylieren kann, deren Hauptsubstrate jedoch DOPA und 5-Hydroxytryptophan (→ Serotonin sind (WEISSBACH, LOVENBURG u. UDENFRIEND, 1961). 2. eine spezifische Histidindecarboxylase, deren Aktivität im ruhenden mastzellreichen Gewebe meist sehr gering ist. Man nimmt an, daß die Speicherung des Histamins (Base) in der Mastzelle durch eine salzartige Bindung an Heparin (SO_3H-Gruppe=Säure) geschieht (WERLE u. AMANN, 1955; KELLER, 1958). Daß tatsächlich der Histaminanstieg beim Foeten mit dem der Mucopolysaccharide in der Mastzelle übereinstimmt, bewiesen SCHAUER und EDER (1962). Auch eine intrazelluläre Bindung des Histamins an ATP, ähnlich der von Noradrenalin und ATP, hält man für möglich. Die Freisetzung des Histamins erfolgt durch teilweise oder vollständige Degranulation, zum Beispiel mit Hilfe geeigneter Liberatoren wie Compound 48/80 oder Reserpin. Eine Entfaltung der physiologischen Wirksamkeit des Histamins an der Gefäßwand ist an den Orten möglich, an denen das wahrscheinlich von einer γ-Globulin Fraktion transportierte, gebundene Histamin durch Hydrolyse freigesetzt werden kann.

Die Bildung des Serotonins in den Mastzellen der Ratte und der Maus geschieht durch Decarboxylierung des 5-Hydroxytryptophans. Zur direkten Bildung aus Tryptophan durch Hydroxylierung und anschließenden Decarboxylierung fehlt wahrscheinlich eine spezifische Tryptophanhydroxylase in der Mastzelle. BIRT, HAGEN

und ZEBROWSKI (1961) wiesen an einem zweijährigen Kind nach, daß beim Menschen selbst die 5-HTP-Decarboxylase zu fehlen scheint.

Die pharmakologisch-physiologischen Wirkungen der oben besprochenen Granulainhaltsstoffe erklären mögliche Mastzellfunktionen. Eine ausreichende Übersicht von den Beziehungen der intrazellulären Speicherstoffe zu den Mastzellfunktionen gibt ein Schema nach NIEBAUER (1968):

Intrazellulärer Nachweis	Mastzellfunktionstheorien
1. Mucopolysaccharide (Bildung, Speicherung, Abgabe)	a) Heparinwirkungen auf Gerinnung und Fibrinolyse b) Einfluß auf die Bildung von retikulären und kollagenen Fasern c) Einfluß auf die Bildung von Gewebssubstanz d) Regulierende Funktion auf den Wasserhaushalt
2. Biogene Amine (Bildung, Speicherung, Abgabe) Histamin Serotonin Katecholamine	a) Vasoaktive Wirkung (Dilatation, Konstriktion) b) Ödem, Entzündung, Stress c) Bedeutender Faktor bei allergischen Reaktionen und bei der Anaphylaxe d) Neuronale Funktion

Der Autor weist jedoch selbst darauf hin, daß für einige dieser und anderer Mastzellfunktionstheorien der endgültige Beweis noch aussteht.

KELLER (1967) bestätigte in seiner Arbeit über die Bedeutung der Mastzelle bei Entzündungen das Fehlen einer klaren Konzeption über alle Funktionen dieser Zelle. Bei akuten Entzündungen tritt infolge des raschen Zellzerfalls eine erhebliche Verminderung der Mastzellzahl ein. Dagegen findet sich bei der chronischen Entzündung, mit proliferativen und gleichzeitig regenerativen Vorgängen im Parenchym oder Bindegewebe eine Vermehrung von Mastzellen.

Das Verhalten der Mastzelle bei der akuten Entzündung kann man wie folgt beschreiben: auf einen intensiven chemischen, toxischen, immunologischen oder thermischen Reiz hin kommt es zum Degranulationsprozeß, wobei nach einer anfänglichen Vergrößerung der Granula die Zelle platzt. Durch den Verlust der Inhaltsstoffe oder gar der ganzen Granula, verliert die Zelle ihre metachromatische Anfärbbarkeit. Aus den nun frei im Gewebe liegenden Granula wird fermentativ Histamin freigesetzt, das als vasoaktiver Stoff zusammen mit Kininen und Peptidasen eine Exsudation bewirkt, indem es die Permeabilität der Kapillar- und Zellmembranen steigert. Dies ist nach KELLERs Meinung zumindest im Frühstadium der akuten Entzündung wie auch des anaphylaktischen Schockes der Fall. Für spätere derartige

Erscheinungen im Verlauf einer Entzündung und beim anaphylaktischen Schock macht er ein weiteres, nicht in den Mastzellen lokalisiertes, histaminbildendes System verantwortlich, das jederzeit, im Gegensatz zur Mastzelle, adaptiv größere Mengen Histamin bilden kann.

Die Literatur über das Vorkommen und die Wirkung von Histamin und Serotonin im Bereich des lymphatischen Rachenringes, insbesondere der Rachenmandel, ist spärlich. Die Rachenmandel, die sich von allen lymphoretikulären Geweben des Waldeyerschen Rachenringes im Alter am deutlichsten zurückbildet und deren Funktion wohl im Zusammenhang mit der allgemeinen Funktion des lymphozytären Systems in der Immunbiologie zu sehen ist (MEYER ZUM GOTTESBERGE und KOBURG, 1967) fand bisher wenig Beachtung.

BOOZ, MOOTZ und MÜSEBECK (1967) fanden bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Lymphknoten der weißen Ratte ein serotoninspeicherndes Zellsystem, dessen Zellen sich histochemisch und morphologisch von den bekannten 5-HT haltigen Rattenmastzellen unterscheiden. Weitere Untersuchungen von MÜSEBECK, BOOZ und MOOTZ (1966) zeigten, daß diese Zellart auch in den menschlichen Tonsillen vorkommt. Die Lokalisation der Zellen beschrieben die Autoren wie folgt: trabekulär, in enger Beziehung zu den Gefäßen, subepithelial, perifollikulär und selten sogar intrafollikulär. Die intrafollikuläre Fluores-

zenz war dabei meist mit einer vermehrten perifollikulären Fluoreszenz, sowie der Anhäufung von Plasmazellen und tryptophanpositiven Zellen verknüpft. Die mit Hilfe der FALCKschen Fluoreszenzmethode zum Nachweis von Serotonin und vergleichenden Färbungen ermittelten Untersuchungsergebnisse ließen vermuten, daß es sich bei diesen 5-HT-Zellen um Makrophagen handelt, die demnach dem RHS angehören.

Über das Vorkommen der Mastzellen in der Tonsilla palatina unter normalen und pathologischen Verhältnissen berichtete MISKOLCZY-FODOR (1950). Zur Darstellung der Mastzellen wandte er die MAY-GRÜNWALD-GIEMSA-Färbung bei frischen Tupf- oder Quetschpräparaten an. Eine direkte Aussage über den Histamingehalt ist dabei nicht möglich. Seine Untersuchungen brachten folgende Befunde: in den Tonsillen finden sich die Mastzellen im bindegewebigen Stroma, in der Kapsel, im faserreichen subepithelialen Gewebe, seltener dagegen im intrafollikulären Retikulum. Keine Mastzellen fand er im Krypteninhalt. Aus der Beobachtung heraus, daß die Mastzellen in lymphatischen Organen vermehrt anzutreffen sind, häufig unmittelbar an leeren Kapillar liegen und in den Keimzentren nie vorkommen (keine Lymphgefäße), schließt der Autor auf eine enge Beziehung zu den Lymphgefäßen und zum Lymphaustausch. Er bestätigt die Untersuchungsergebnisse von STÄMMLER (1921), der für die Tonsillen eine Vermehrung der Mastzellen bei chronischen, indurativen Prozessen, meist im Verhältnis zur Bindegewebsneubildung und eine Verminderung bei

akuten Entzündungen feststellte.

Auch DRABE (1960) bestätigt diese Ergebnisse. Er kommt jedoch durch den Befund, daß die augenfälligen Mastzellansammlungen weniger an den Stellen chronischen Granulationsgewebes, als vielmehr in jüngeren, mehr oder weniger zellreichen Bindegewebspartien anzutreffen sind, zu der Theorie, daß die Mastzelle vermutlich durch die Ausschüttung von sauren Mucopolysacchariden an der Bildung des Bindegewebes beteiligt ist. Dabei weist er auf vergleichbare Ergebnisse von STÄMMLER (1921), ASBOE-HANSEN (1950) und SYLVEN (1941) hin.

Für die Mastzellverteilung bei chronischer Tonsillitis erhebt er folgende Befunde: In den Trabekeln und im Kapselbereich sind immer Mastzellen vorhanden, auch sind sie in bindegewebigen Narbenzügen sehr zahlreich. Dagegen trifft man sie im Lymphozytenwall um die Follikel nur gelegentlich an, im retikulären Kryptenepithel finden sie sich sehr selten und im geschlossenen Oberflächenepithel kommen sie fast nie vor. Der Krypteninhalt und die Follikel sind mastzellfrei.

PSAKHIS (1967) untersucht das Vorkommen und die Veränderung der Mastzellen bei hypertrophierten und chronisch entzündeten menschlichen Rachenmandeln. Die Auswertung der Befunde der Rachenmandel von 110 Personen ergibt in 70 % der Fälle eine Hypertrophie in Verbindung mit einer chronischen Entzündung,

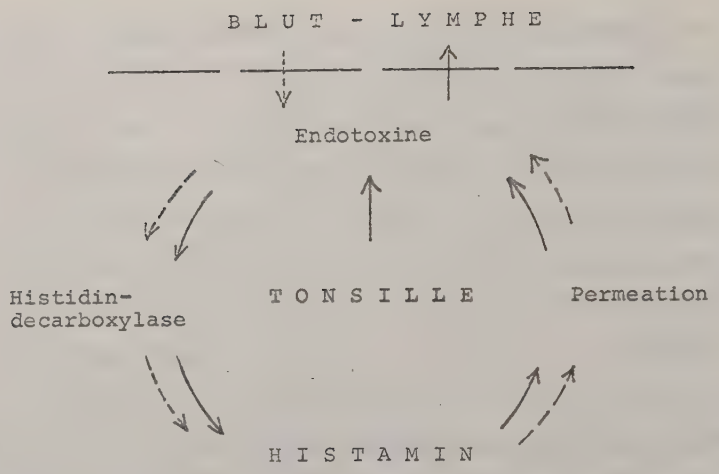
in 30 % eine gewöhnliche Hyperplasie. Als wichtigste histomorphologische Untersuchungsergebnisse nennt er erstens die Vermehrung der Mastzellzahl im Bindegewebe bei chronischer Adenoitis und zweitens die Tatsache, daß quantitative und qualitative Änderungen der Mastzellen während der gleichen Erkrankung in einem noch ungeklärten Zusammenhang mit Strukturstörungen und chemischen Veränderungen des Bindegewebes stehen.

Den Histamingehalt der menschlichen Rachenmandel untersucht WILCKE (1969). Mit Hilfe einer papierchromatographischen Methode ermittelt er einen Wert von 4,4 µg/g Frischgewebe in diesem Organ. Das bedeutet nur etwa die Hälfte, der von LORENZ, HEITLAND, WERLE, SCHAUER und GASTPAR (1968) mit der spektrofluorometrischen Methode nach SHORE, BURKHALTER und COHN (1959) festgestellten Konzentration von 10,7 µg/g Frischgewebe in der Gaumenmandel. Dennoch veranlaßt dieses Ergebnis, des im Vergleich zu anderen Organen immer noch hohen Histamingehaltes der Rachenmandel, den Autor zu der Annahme, daß die Histaminfreisetzung bei der anaphylaktischen Reaktion und den Entzündungsprozessen auch bei der Rachenmandel eine Rolle spielt.

Mit der Speicherung und Bildung, sowie dem Umsatz und der Funktion des Histamins in der menschlichen Tonsille beschäftige sich GASTPAR und LORENZ (1967). Bezüglich der Bildung des Histamins bestätigen sie das Vorhandensein einer spezifischen

und einer unspezifischen Histidindecarboxylase. Die Neubildung des Histamins wird ihrer Ansicht nach im Sinne eines Rückkoppelungseffektes gesteuert, bei dem die Histaminkonzentration in den Nichtmastzellspeichern der auslösende Faktor ist. Die Histaminkonzentration und Mastzelldichte der Tonsilla palatina und pharyngea geben beide als eine der höchsten unter allen untersuchten Organen an, wobei es ihnen nicht möglich ist, die prozentuale Verteilung des Histamins auf Mastzelle und Nichtmastzellspeicher genau festzulegen, da in Versuchen mit dem Histaminliberator Compound 48/80, der nur Mastzellhistamin freisetzt, der Histamingehalt nicht signifikant abfiel. Auch einen möglichen Histamingehalt der von MÜSEBECK, MOOTZ und BOOZ (1966) beschriebenen Serotoninzellen in den Tonsillen wurde von den Autoren diskutiert. GASTPAR und LORENZ gelang auch der Nachweis einer spezifischen Diaminoxydase von relativ hoher Aktivität in der Tonsille, die Histamin umsetzt.

Die Funktion des Histamins sehen die Autoren in einer Mediatorstellung beim Endotoxinaustausch zwischen Lymphbahn und Tonsillengewebe. Sie schreiben: "Die lymphoretikulären Strukturen der Lymphknoten und Tonsillen sind in der Lage, endogene Toxine herauszufiltern, zu speichern und zu inaktivieren. Histamin bewirkt über eine gesteigerte Gefäßpermeabilität eine beschleunigte Permeation dieser Noxen aus der Blutbahn und den Lymphgefäßen. Am deutlichsten ist diese histamininduzierte Permeabilitätssteigerung am venösen Schenkel des Kapillargebietes. Da aber Endotoxine die Aktivität der spezifischen Histidindecarboxylase steigern, fördern sie eine Histaminneubildung und lösen somit einen Mechanismus aus, der über eine erhöhte Permeation zu einer beschleunigten Eliminierung neuer Endotoxine führt.



Im Falle eines intratonsillären Entzündungsherdes löst das dort freigesetzte Endotoxin ebenfalls eine Histaminneubildung aus, die über eine Permeabilitätssteigerung, aber nun in umgekehrter Richtung, eine Ausschwemmung dieser Noxen in die Blut- und Lymphbahn fördert. So stellt möglicherweise der hohe Histamingehalt und der rege Stoffwechsel des Histamins im Tonsillengewebe einen wesentlichen Faktor beim Fokalgeschehen dar, wobei Histamin gewissermaßen eine Mediatorfunktion in einem Regelkreis ausübt, der die Ausschwemmung tonsillogener Noxen in die Blut- und Lymphbahn steuert".

Zum Histaminnachweis sind in der Literatur bisher zahlreiche morphologisch-histochemische Nachweismethoden beschrieben worden. Die Tatsache, daß Histamin eine relativ niedermolekulare frei diffusible, wasserlösliche Substanz ist, bereitete der histochemischen Darstellung Schwierigkeiten.

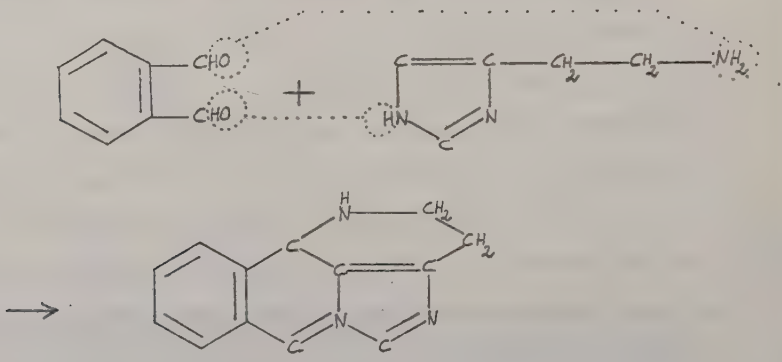
SCHAUER und WERLE veröffentlichten 1959 als erste eine histochemische Nachweismethode für Histamin. Die Autoren fällten das Histamin mit Reineckesalz aus. Den rhomboiden Kristallniederschlag identifizierten sie als Histamindehydrochlorid. Eventuell störende Substanzen wie die Basen Serotonin, Histidin oder Protamine zeigten mit Reineckesalz eine andere Reaktion: Unter Serotonin bildeten sich büschelförmige Kristalle, bei Histidin kam es erst unter starken Reineckesalzkonzentrationen zu einem kristallinen Niederschlag und Protamine fielen amorph aus. Bei dieser Methode werden die Mastzellgranula auch am ungefärbten Präparat deutlich erkennbar. Die darin enthaltenen Kristalle leuchten im Dunkelfeld auf. Die färberische Darstellung des Histaminreineckats erfolgt durch Diazotierung. Für Histamin ist die rote Farbe charakteristisch (Serotonin führt zu einer Braunfärbung, Protamin ist nicht diazotierbar).

LAGUNOFF, PHILIPPS und BENDITT (1961) machten das Histamin nach Formaldehyddampffixation und Kopplung mit diazotiertem p-Bromanilin im UV-Licht sichtbar. Dabei wandten sie erstmals die Gefriertrocknungstechnik an, um eine Diffusion des Histamins aus der Zelle zu verhindern.

Die Entwicklung einer fluorometrischen Technik zur quantitativen Bestimmung von Gewebshistamin gelang SHORE, BURKHALTER und COHN (1959). Hierbei wird zunächst ein Histaminextrakt mit Hilfe

von n-Butanol aus alkalisiertem, perchlorischem Säuregewebsextrakt gewonnen. Das Histamin wird dann in eine wässrige Lösung umgewandelt und schließlich mit o-Phthalaldehyd kondensiert. Man erhält dabei ein Produkt mit starker und stabiler Fluoreszenz. Die quantitative Auswertung erfolgt mit einem Spektrofluorometer.

Folgende chemische Reaktion gilt als wahrscheinlich:



Um die Spezifität dieses Histaminkondensationsproduktes zu sichern, wurden mehrere Substanzen getestet, die mit o-Phthalaldehyd (OPT) ebenfalls eine fluoreszierende Verbindung bilden. Acetyliertes, methyliertes, alkyliertes, carboxyliertes und desaminiertes Histamin zeigen dabei ein anderes Fluoreszenzspektrum. Histidin und Histidylhistidin bewirken zwar ähnliche Spektren wie Histamin, werden jedoch durch Butanol aus dem Gewebe nicht extrahiert. Auf Grund der hohen Sensibilität dieser Methode können Konzentrationen bis zu 0,005 mg/ml erfaßt werden

Dabei ist die Fluoreszenzintensität von 0,005-0,5 µg/ml der Histaminkonzentration proportional. Dieser fluorometrische Nachweis bildet die Grundlage der von JUHLIN und SHELLY (1966) veröffentlichten Histaminnachweismethode. Die bekannte Reaktion von Histamin und OPT wird hierbei benutzt, um das Histamin in seinen Zelldepots sichtbar zu machen. Dabei muß die Diffusion des Histamins aus den Zellen verhindert werden, ebenso darf OPT nur in H_2O-freien Lösemitteln gelöst werden. Grundsätzlich können mit dieser Methode sowohl Zellsuspensionen (Blut, Peritonealflüssigkeit), frisches Gewebe, als auch gefrorenes Gewebe angefärbt werden. Das Histamin fluoresziert im Fluoreszenzmikroskop gelb. Die Autoren deuten schon an, daß die Technik des Anfärbens von gefrorenem Gewebe gegenüber den anderen entscheidende Vorteile besitzt. Die Histaminmenge, welche auf einen lokalen, mechanischen, thermischen oder chemischen Reiz hin aus den Mastzellen freigesetzt wird, ist auf ein Mindestmaß reduziert.

Als Spezifitätskriterien gelten im Wesentlichen die gleichen wie bei SHORE, BURKHALTER und COHN (1959). Beispielsweise lassen sich die histaminhaltigen Mastzellen nach Histaminextraktion nicht mehr fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.

SHELLY, ÖHMAN und PARNES (1968) verwenden bei ihren Untersuchungen nur in Paraffin eingebettetes gefriergetrocknetes Gewebe, da mit dieser Technik die besten Ergebnisse erzielt

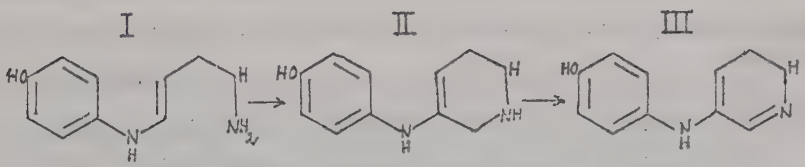
werden. Die Methoden zur Bestimmung von Serotonin in biologischem Material werden von CRAWFORD und RUDD (1962) in drei Hauptgruppen unterteilt. 1. die biologischen Versuche, die von bestimmten Geweben (Rattencolon, Uterus, Magen) abhängig sind; 2. die halbquantitativen chromatographischen, und 3. die Methoden, welche den Gebrauch eines Spektrofluorometers erfordern. Zu dieser letztgenannten Gruppe ist auch der von uns verwandte fluoreszenzmikroskopische Serotoninnachweis nach FALCK und HILLARP (1963) zu zählen.

Das völlige Fehlen von Kenntnissen bezüglich der Lokalisation der neuronalen Monoamine im Gewebe veranlasste HILLARP zusammen mit CARLSSON umfangreiche Experimente durchzuführen, mit dem Ziel, eine histochemische Nachweismethode zu entwickeln. Die für den augenblicklichen Nachweis grundlegende Entdeckung gelang HILLARP, der nachweisen konnte, daß Katecholamine durch Formaldehydbedampfung in einer trockenen Proteinschicht zu einer stark fluoreszierenden Verbindung kondensiert werden können. FALCK (1962) wandte diese Methode zum Nachweis von Monoaminen, zu denen die Katecholamine wie Adrenalin, Noradrenalin sowie das Serotonin gehören, erfolgreich an. Die Trockenheit der Proteinschicht gewährleistete er durch Gefriertrocknung des Gewebes.

Befunde zur Aufklärung der physiko-chemischen Grundlagen der Methode durch CORRODI und HILLARP (1963-1964) zeigen folgendes:

Wenn ein ursprüngliches (primäres) Katecholamin zum Beispiel Noradrenalin in einer getrockneten Proteinschicht (Gefriertrocknung) mit etwas feuchtem Formaldehyd behandelt wird, erfolgt sofort eine Kondensation unter Bildung von 6,7-dihydroxy 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin (Pictet- Sprengler- Reaktion). Danach eine rasche Dehydration von tetrahydroisoquinolin zu seinem korrespondierenden 3,4-dihydroisoquinolin (Katalysator: Glycin, Alanin). Die 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline stehen dabei in einem vom pH-Wert abhängigen Gleichgewicht mit den korrespondierenden tautomeren Aminodalformen. Die Absorption dieses Gleichgewichtes erfolgt streng von 360-420 mμ bei einer Spitze von 390mμ. Intensive Fluoreszenz bei 480mμ.

Serotonin in einer trockenen Proteinschicht eingelagert und mit Formaldehyd bedampft, bildet im ersten Schritt 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin und im zweiten Schritt dann 6-hydroxy-3,4-tetrahydro-β-carbolin (siehe Schema)



I = Serotonin

II = 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin

III = 6-hydroxy-3,4-tetrahydro-β-carbolin

Die Sensibilität dieser Methode ist sehr hoch. In einer 10μ dicken Proteinschicht kann Serotonin in Konzentrationen von 1,5 μg/g Protein nachgewiesen werden (begrenzender Faktor: Eigenfluoreszenz des Proteins). DAHLSTRÖM, HÄGGENDAHL und HÖKFELT (1966) berechneten mit Hilfe der Fluoreszenz in den Varikositäten (Lager und Freisetzungsorte der adrenergen Transmittersubstanzen) eines peripheren adrenergen Nerven einen Katecholamin-Gehalt von 5×10^{-9} μg, was einer Konzentration im varikösen Cytoplasma von $1\text{-}4 \times 10^{3}$ μg/g Feuchtgewicht entspricht. Eine Proportionalität der Fluoreszenzintensität zur Serotoninkonzentration konnte nicht festgestellt werden.

Hauptkriterien der Spezifität sind:

1) Reaktionsbedingungen, bestehend aus Wassergehalt des Formaldehyd, Einwirkungszeit des Formaldehyd und Temperatur während der Einwirkungszeit des Formaldehyd. Fluoreszenzintensitätsschwankungen bei der histochemischen Behandlung von Mastzellen verschiedener Gewebe, die nicht konzentrationbedingt sind, weisen auf methodisch bedingte Unterschiede hin. Die Relation von Gewebswasser und Wassergehalt des Formaldehyd ist von entscheidender Bedeutung und muß für jedes Gewebe neu ausgetestet werden (FALCK, 1962).

2) Spektrale Charakteristiken: Serotonin Excitation/Emission 410 / 525 mμ

Katecholamine max.Emission bei 480mμ
max.Aktivität 410mμ

3) Natrium-Borhydrid Reduktionstest

Die chemische Behandlung mit geringen $NaBH_4$-Konzentrationen in alkoholischer Lösung führt zur quantitativen Reduktion der fluoreszierenden 3,4-dihydroisoquinoline und 3,4-dihydro-β-carbolin zu ihren entsprechenden nichtfluoreszierenden 1,2,3,4-tetrahydroderivaten. Der Vorgang ist reversibel.

4) Abnahme der Fluoreszenzintensität unter UV-Bestrahlung.

5) Fluoreszenzauslöschung durch wasserhaltige Eindeckungsmedien.

Zur Unterscheidung zwischen den Monoaminen, Katecholaminen und Serotonin, bieten sich folgende Differenzierungsmöglichkeiten an:

1) Die Verschiedenheit der Emissionsspektren
2) Unterschiedlich schnelle Photolyse
3) Aussetzung in HCL

Katecholamine ändern dabei ihre spektralen Charakteristiken

4) Unterschiedliche Reaktionsbedingungen zur optimalen Fluoreszenz.

Mit der Fluoreszenzmethode nach FALCK und HILLARP können folgende Verbindungen auf zellulärer Ebene histochemisch demonstriert werden:
Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin sowie deren Vorstufen 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA) und 5-hydroxytryptophan.

Material und Methodik

Untersucht wurden 17 menschliche Rachenmandeln (Operationsmaterial). Als histologische Färbemethoden wurden verwandt:

1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung
2. Toluidinblaufärbung
3. Fluoreszenzmikroskopischer Histaminnachweis in den Mastzellen nach SHELLY, ÖHMAN und PARNES (1968)
4. Fluoreszenzmikroskopischer Serotoninnachweis nach FALCK und HILLARP (1963).

Bei dem für beide fluoreszenzmikroskopische Nachweismethoden gleichen Vorgang der Gefriertrocknung wird das noch lebensfrische Gewebe in Blöckchen von einer maximalen Kantenlänge von 3 mm zerlegt und sofort in Iso-Pentan, das mit Kohlensäureschnee in Aceton auf -70°C heruntergekühlt wird, eingefroren. Einbringen der Gewebeblöckchen in die auf -40°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage (Alpha-I-Gefriertrocknungsanlage der Fa.Christ), die durch den Einbau eines Peltier-Elementes den Gefriertrocknungsprozeß sehr vereinfacht. Folgende Trocknungszeiten halten wir für ausreichend: 6 Stunden bei -45°C, 12 Stunden bei -25°C und 6 Stunden bei Zimmertemperatur.

Zum Histaminnachweis wird das Gewebe anschließend unter Vakuum in entgastes Paraffin eingebettet. Anfertigung von 10 m dicken Schnitten, die auf saubere, trockene Objektträger gelagert und dann bei 60°C etwa 1-2 Minuten auf eine Wärmeplatte gebracht werden, um das Paraffin zu schmelzen. Die Färbung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 100 % Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur. Dabei wird der Objektträger mit 1%igem o-Phthalaldehyd in Xylol überschichtet. Eindecken in Tetrahydrofurfurylalkohol.

Die von SCHAUER und WERLE (1959) vorgeschlagene intrazelluläre Histaminfällung durch Reineckesalz und anschließende Diazotierung des Reaktionsproduktes mit Sulfanilsäure, wird wegen ihrer zahlreichen unspezifischen Nebenreaktionen und der ausschließlichen Reproduzierbarkeit am Häutchenpräparat weitgehend abgelehnt. Die Bedampfung des Gewebes mit Formaldehyd und die darauf folgende Diazotierung mit p-Bromanilin (LAGUNOFF, PHILIPPS u. BENDITT, 1961) führt weniger zu Histamin- als zu Serotoninkondensationsprodukten (LISON, 1966), da die Serotoninkonzentration fast aller Gewebe 1/10 der Histaminkonzentration übersteigt. Die Autoren selbst weisen darauf hin, daß daher mit unspezifischen Reaktionen gerechnet werden muß. Ihr großes Verdienst war die Einführung der Gefriertrocknung zur Verhinderung der Diffusion des Histamins aus den Mastzellen.

Entscheidende Vorteile gegenüber diesen Methoden besitzt der im Jahre 1966 von SHELLY und JUHLIN veröffentlichte fluoreszenzmikroskopische Histaminnachweis. Dieser Technik liegt die Tatsache zu Grunde, daß Histamin bei o-Phthalaldehydbedampfung ein Kondensationsprodukt bildet, das im Fluoreszenzmikroskop gelb aufleuchtet. Durch Verwendung eines wasserfreien Lösungsmittels für den OPT, wird die Diffusion des Histamins aus den Mastzellen verhindert. Der Chemismus der Technik geht auf die Entwicklung eines spektrofluorometrischen Histaminnachweises durch SHORE, BURKHALTER und COHN (1959) zurück, welcher eine außerordentlich hohe Spezifität und Sensibilität aufweist. Die beiden letztgenannten Nachweismethoden für Histamin zeigen sich allen bisher erwähnten weit überlegen und dürfen als Grundlage des fluoreszenzmikroskopischen Histaminnachweises von SHELLY, ÖHMAN und PARNES (1968) angesehen werden.

Diese Autoren beschränkten ihre Versuche auf gefriergetrocknetes Gewebe. Durch die Einbettung des gefriergetrockneten Gewebes in Paraffin bei der Anfärbung erreichen sie eine Fluoreszenzintensität, die eine genaue Lokalisation der Zellen ermöglicht. Auch die mikroskopische Auswertung ist durch dieses Verfahren nicht mehr zeitlich auf wenige Minuten begrenzt, sondern die Gewebsstückchen können nun bedenkenlos monatelang gelagert werden. Diese Methode, welche zu jedem Zeitpunkt des Versuchs eine Verhinderung der Histamindiffusion aus der Zelle gewährleistet, verwandten wir zum Histaminnachweis in der menschlichen Rachenmandel. Sie erweist sich für routinemäßige Laboruntersuchungen als ausgezeichnet geeignet.

Beim Serotoninnachweis wird das gefriergetrocknete Gewebe sofort in einen Exsikkator gebracht und über Paraformaldehyd von einem adäquaten Feuchtigkeitsgehalt im Brutschrank bei +80° C 1 bis 3 Stunden bedampft (zum Erreichen eines Optimum an Fluoreszenzintensität erweist sich der Paraformaldehyd, der bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-80 % eingestellt wird, als geeignet). Einbetten der bedampften Gewebeblöckchen in Paraffin. Danach Anfertigung von etwa 10 µm dicken Schnitten, die auf trockenen, gereinigten Objektträgern mit Hilfe einer Wärmeplatte bei 60°C gestreckt werden. Nach Erkalten Einbettung in Paraffin.

Die fluoreszenzmikroskopischen Nachweismethoden für Serotonin besitzen wegen ihrer hohen Spezifität und Sensibilität sowie der geringen Aufwendigkeit entscheidende Vorteile gegenüber anderen bekannten Techniken. CRAWFORD und RUDD (1962) stellen die von HESS und UDENFRIED (1959) entwickelte spektrofluorometrische Methode zur Serotoninmessung auf Grund dieser Kriterien in der Bedeutung über die biologischen Versuche und die halbquantitativen chromatographischen Methoden. Auch BOOZ (1967) beobachtete bei seinen Untersuchungen zum Serotoninstoffwechsel in den Mastzellen der weißen Ratte, daß die üblichen Serotoninnachweismethoden (chromaffine Reaktion, die Diazo-, Gibb'sche Indophenol-, die Nynhydrin- und die argentaffine Reaktion) unzureichende Ergebnisse liefern.

Aus diesen Gründen verwandten wir zum Nachweis von Serotonin in den 5-HT-Zellen der menschlichen Rachenmandel ausschließlich die fluoreszenzmikroskopische Nachweismethode nach FALCK und HILLARP (1963). Bei dieser Technik bilden die Katecholamine durch die Formaldehydbedampfung in einer trockenen Proteinschicht ein stark fluoreszierendes Kondensationsprodukt. Die Einführung der Gefriertrocknung (FALCK, 1962) und das Einbetten des Gewebes in Paraffin verhindern die Diffusion des Serotonins aus den Zellen und gewährleisten immer eine Reproduzierbarkeit.

Die Auswertung bei beiden fluoreszenzmikroskopischen Nachweismethoden erfolgt mit dem LEITZ-Mikroskop ORTHOPLAN mit Fluoreszenzeinrichtung und automatischer Mikroskopkamera ORTHOMAT im Dunkelfeld. Erregerfilter beim Histaminnachweis UG 1, Kantenfilter K 430. Bei dieser Einstellung fluoreszieren die histaminhaltigen Mastzellen intensiv gelb auf blauem Untergrund. Erregerfilter beim Serotoninnachweis: BG 12 (5+1,5 mm), zum Teil in Kombination mit dem Rotdämpfungsfilter BG 38 (4 mm). Sperrfilter K 510. Bei dieser Einstellung fluoreszieren die serotoninhaltigen Zellen gelb auf fast dunklem Untergrund.

Ergebnisse

Mit den angewandten fluoreszenzmikroskopischen Nachweismethoden gelingt der Nachweis von Histamin und Serotonin in der menschlichen Tonsilla pharyngea.

Die Rachenmandel als lymphoepitheliales Organ ist von einem mehrreihigen Flimmerepithel bedeckt, in das Inseln von mehrschichtigem Plattenepithel eingestreut sind. Nach außen wird sie durch eine schmale bindegewebige Kapsel mit darunterliegenden gemischten Drüsen begrenzt. Der Feinbau ihres lymphoretikulären Gewebes gleicht dem der Tonsilla palatina. Dieses subepithelial gelegene Gewebe wird von zahlreichen Blutkapillaren durchzogen. Die Zahl der Sekundärknötchen mit ihren Reaktionszentren und dem peripheren Lymphozytenmantel wechselt individuell. Die Lymphozytenkappe ist stets dem Epithel zugewandt. Die Krypten sind im Gegensatz zur Gaumenmandel weniger tief und ausgeprägt (Abb. 1)

Mit Hilfe der Toluidinblaufärbung finden sich metachromatisch angefärbte Mastzellen

1. trabekulär
2. perifollikulär
3. kapsulär
4. subepithelial
5. seltener im Oberflächen- und Kryptenepithel.

Abb. 1: Menschliche Rachenmandel
Unter dem mehrreihigen Flimmerepithel als Kryptenauskleidung finden sich zahlreiche Sekundärfollikel mit epithelzugewandtem Lymphozytenmantel.
Die Krypten sind relativ weit.
Toluidinblaufärbung. Vergr. 40x

Zu 1: trabekulär trifft man die Mastzellen in enger Nachbarschaft zu den hier verlaufenden Blutgefäßen (Abb.2). Dabei besitzen die in unmittelbarer Gefäßnähe liegenden Mastzellen meist eine längliche Form, während sie mit zunehmender Abwanderung von den Blutgefäßen deutlich rundlich geformt sind.

Im Histaminnachweis fluoreszieren die Mastzellen intensiv gelb auf schwach bläulichem Untergrund. Die Lumina der Blutgefäße heben sich als schwarze Bezirke von der Umgebung deutlich ab. Die als gelbbläuliche Linie erkennbare Elastica interna größerer Trabekelgefäße erleichtert eine Zuordnung der Mastzellen zu den Gefäßen. Wie Abb.3 zeigt, liegen die Granula der Mastzellen so dicht nebeneinander, daß der Zellkern überdeckt wird.

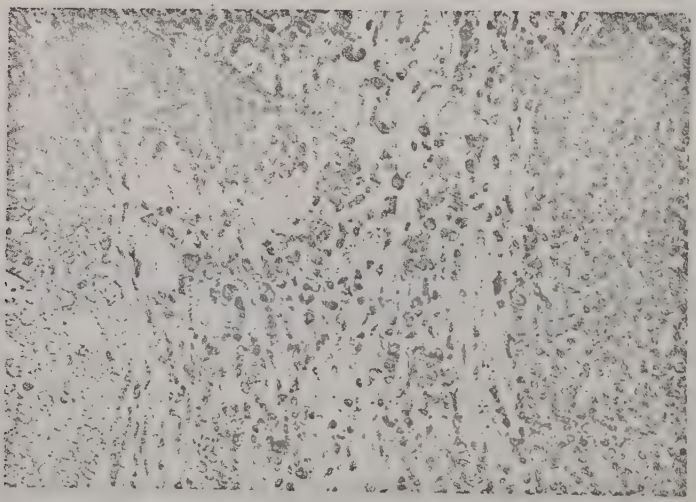


Abb. 2: Mastzellen in der menschlichen Rachenmandel

Mastzellen im interstitiellen Bindegewebe zwischen zwei Sekundärfollikeln. Die Mastzellen sind nicht einheitlich geformt. Sie besitzen eine länglich bis polygonale Form.

Toluidinblaufärbung. Vergr. 250x

Zu 2: perifollikulär liegen die Mastzellen in enger topographischer Beziehung zu dem Lymphozytenmantel. Die im Histaminpräparat (Abb. 3) gelblich fluoreszierenden Mastzellen heben sich deutlich vom bläulich-gelblich erscheinenden Bindegewebe ab, wodurch eine Trennung möglich wird. Im Follikel selbst gelingt mit keiner Methode ein Mastzellnachweis.

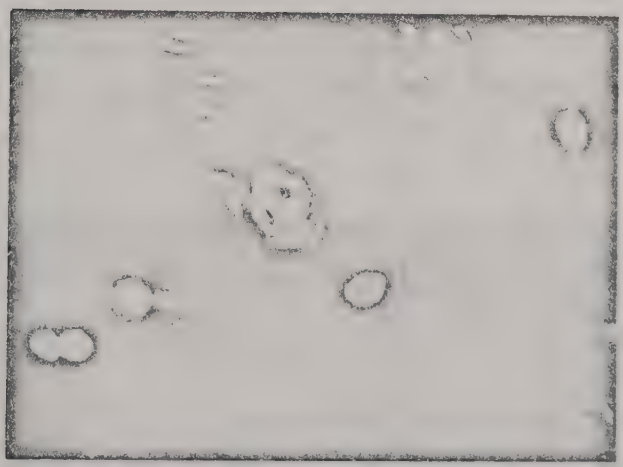


Abb. 3: Fluoreszenzmikroskopischer Histaminnachweis in der menschlichen Rachenmandel (Methode nach SHELLY, ÖHMAN und PARNES, 1968)

Rundliche, reife Mastzellen weiter von der Gefäßwand entfernt.

Vergr. 10x40

Zu 3: in der Bindegewebskapsel finden sich nur ganz sporadisch Mastzellen, die dann wiederum länglich geformt in enger Nachbarschaft zu den Blutgefäßen anzutreffen sind.

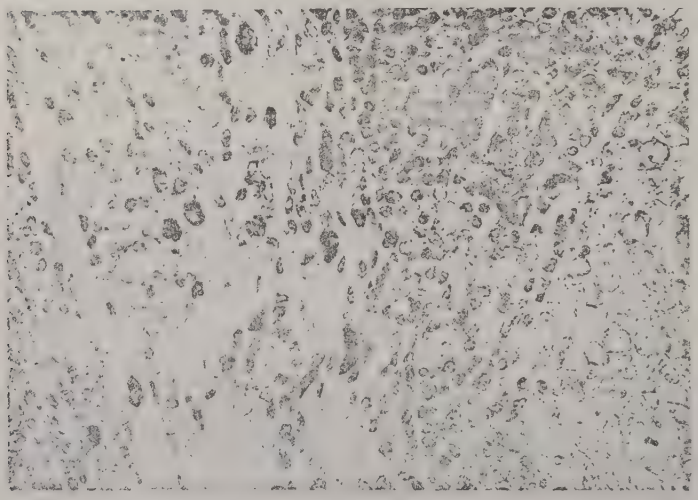


Abb. 4: Menschliche Rachenmandel.

Enges Anschmiegen der Mastzellen an den Lymphozytenmantel. Formvarianten der Zellen: länglich, oval, rundlich, polygonal.

Toluidinblaufärbung. Vergr. 10x40

Zu 4: die im subepithelialen Bindegewebe relativ zahlreich vorkommenden, runden bis ovalen Mastzellen zeigen oft eine unmittelbare Beziehung zum Oberflächenepithel.

Zu 5: im Kryptenepithel konnten wir in dem von uns untersuchten Material keine Mastzellen nachweisen.

Beim Serotoninnachweis in der menschlichen Rachenmandel finden sich die serotoninhaltigen Zellen in einer ähnlichen Verteilung wie die Mastzellen. Man trifft sie jedoch vereinzelt auch intrafollikulär an. Die 5-HT-Zellen besitzen etwa dreifache Lymphozytengröße, sind sehr granulahaltig und orthochromatisch anfärbbar. Im Serotoninpräparat fluoreszieren sie gelb auf fast dunklem Untergrund (Abb.5 und 6). Die 5-HT-Zellen konnten von uns in keinem Fall als Mastzellen identifiziert werden. Sie zeigen keine Histaminfluoreszenz.

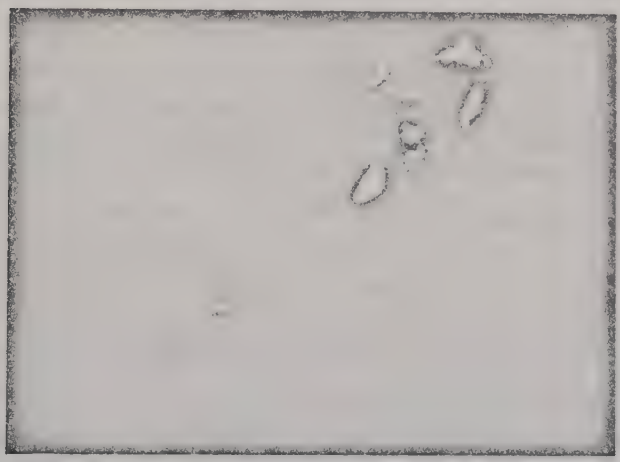


Abb. 5: Menschliche Rachenmandel.
Fluoreszenzmikroskopischer Serotoninnachweis nach FALCK und HILLARP (1963). Gelbfluoreszierende serotoninhaltige Zellen.
Vergr. 10x25

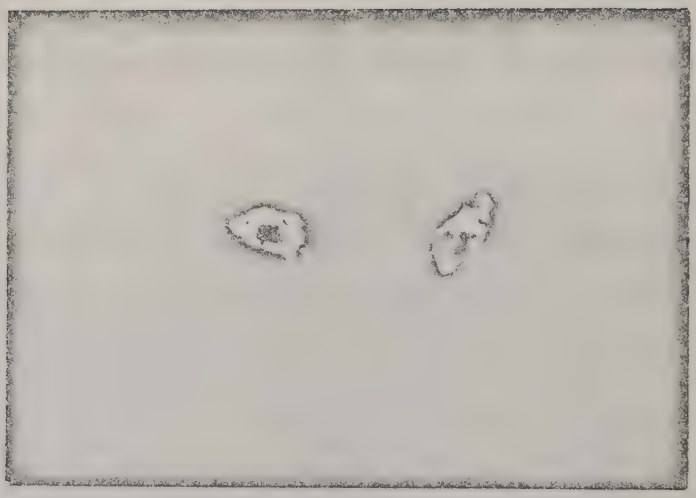


Abb. 6: Zwei 5-HT-Zellen in der menschlichen Rachenmandel, gelbfluoreszierendes Cytoplasma mit dunkler Kernaussparung.

Vergr. 10x40

Diskussion

Mit der fluoreszenzmikroskopischen Nachweismethode nach SHELLY, ÖHMAN und PARNES (1968) wird in vorliegender Arbeit erstmalig Histamin in den Mastzellen der menschlichen Rachenmandel morphologisch lokalisiert. Dabei entspricht die Verteilung der Mastzellen nach unseren Ergebnissen der in der Tonsilla palatina, welche von nahezu allen Autoren übereinstimmend beschrieben wird (MISKOLCZY-FODOR, 1950; DRABE, 1961; HÜBERS, 1970). Die Mastzellen finden sich trabekulär, perifollikulär, kapsulär, im subepithelialen Bindegewebe und selten im Oberflächenepithel, niemals in den Follikeln. Vergleichende Färbungen bestätigen diese Befunde. Eine Aussage über den quantitativen Gehalt der Rachenmandel an Histamin erlaubt diese Methode nicht. Der von WILCKE (1969) mit einer papierchromatographischen Methode ermittelte Wert in diesem Organ beträgt 4,4 µg/g Frischgewebe.

Beim angewandten Serotoninnachweis zeigen die serotoninhaltigen Zellen in der Rachenmandel eine ähnliche Verteilung wie die Mastzellen, sind allerdings nicht so gehäuft anzutreffen wie in der Gaumenmandel. Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um Makrophagen, wie vergleichende Färbungen ergaben, wobei eine exakte Zuordnung jedoch nicht möglich ist. Diese serotoninhaltigen Zellen konnten von uns in keinem Fall als

Mastzellen identifiziert werden, wobei wir die Definition der Mastzelle nach SELYE (1965) zu Grunde legen: "Mastzellen kommen im Bindegewebe vor und enthalten zytoplasmatische Granula, die sich unter gewöhnlichen histologischen Bedingungen metachromatisch färben". Diese Definition erscheint derzeit am geeignetsten, wobei Morphologie und funktionelle Bedeutung dieser histaminspeichernden Zelle noch keineswegs befriedigend geklärt sind. Sie ergibt sich aus der Reaktion der Mastzelle mit basischen Anilinstoffen (Metachromasie) und ist vom Autor nach Durchsicht von 8500 Arbeiten über die Mastzelle formuliert worden. Als endgültig darf sie jedoch nicht angesehen werden. Sie ermöglicht zwar eine Unterscheidung von der Blutmastzelle und von epithelialen Zellen, die auch metachromatische Granula enthalten, indem das Vorkommen der Zelle auf das Bindegewebe festgelegt wird, erfaßt aber beispielsweise nicht jene Gewebsmastzellen, die bei pathologischen Zuständen ihre Granula abstoßen und dadurch nicht mehr anfärbbar sind (ghostcells), obwohl diese noch volle Regenerationsfähigkeit besitzen. Gemäß dieser Definition müßte man auch Histiozyten oder Fibroblasten nach der Phagozytose metachromatischen Materials in Form von Granula als Gewebsmastzellen bezeichnen.

Die von manchen Autoren verwandten Unterbezeichnungen der Gewebsmastzelle, wie Histaminozyt oder Heparinozyt, weisen auf die unterschiedlichen im Vordergrund stehenden Funktionen hin, die man dieser Zelle auf Grund ihrer Inhaltsstoffe zu-

schreibt. Unklar bleibt auch, ob es sich bei den verschiedenen species- und organabhängigen physiologischen und morphologischen Erscheinungsformen der Mastzelle, die rund, oval, spindelförmig und dendritenzellartig sein kann, um differenzierte Zustandsbilder oder um Phasen im Lebenszyclus handelt. Daher scheint die Feststellung von LINDNER (1960) "Mastzelle ist nicht gleich Mastzelle" noch heute ihre Gültigkeit zu besitzen. Die Mastzelle ist letzten Endes wohl als Sammelbegriff für verschiedene Zelltypen mit metachromatischer Granulation aufzufassen, wobei weitere Differenzierungen zukünftigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen vorbehalten sein werden (NIEBAUER, 1968).

Bezüglich des Stoffwechsels des Histamins in der Mastzelle, müssen die intrazelluläre Aufnahme, die Bildung sowie die Speicherung und der Umsatz als bewiesen gelten. Nicht geklärt ist das Vorkommen des Serotonins in der menschlichen Mastzelle. In den Mastzellen der weißen Ratte gilt es hingegen als gesichert (BOOZ, 1967). Die Synthese zum 5-hydroxy-tryptophan ist offenbar möglich, wogegen das Ferment zur 5-hydroxy-tryptaminbildung zu fehlen scheint (BIRT, HAGEN u. ZEBROWSKI, 1961). MÜSEBECK, BOOZ und MOOTZ (1966) beobachteten in der menschlichen Tonsille tryptophanpositive Mastzellen, die aber keine Serotoninfluoreszenz zeigten. Auch unsere Untersuchungsergebnisse an der menschlichen Rachenmandel liefern keine Anhaltspunkte für das Vorkommen des Serotonins in den menschlichen Mastzellen.

Vorkommen und Lokalisation der Mast- und 5-HT-Zellen lassen keinen endgültigen Schluß über die Bedeutung dieser Zellen bzw. des Histamins und Serotonins in der Rachenmandel zu. Sie muß wohl in Verbindung mit der noch ungenügend geklärten Physiologie des Organs gesehen werden. Das Organ ist wegen seiner geringen Kryptenzahl gegenüber der Gaumenmandel infektanfälliger und erweist sich reich an immunglobulinhaltigen Plasmazellen. Es erfährt nach der Pubertät eine starke Involution. Was die Mastzelle betrifft, vermutet PSAKHIS (1969) einen Zusammenhang zwischen ihren quantitativen und qualitativen Veränderungen bei adenoiden Vegetationen und den Strukturstörungen und chemischen Veränderungen des Bindegewebes. WILCKE (1969) diskutiert eine Histaminfreisetzung bei Entzündungen und im anaphylaktischen Schock auch in der Rachenmandel, ebenso eine Beteiligung des Histamins an der Bindegewebsneubildung. Die von GASTPAR und LORENZ (1967) beschriebene Mediatorfunktion des Histamins beim Endotoxinaustausch in der Gaumenmandel kann auch wegen der auffallenden Übereinstimmung bezüglich der Mastzellverteilung in der Rachenmandel vermutet werden.

Auf welche Weise das Serotonin in den Stoffwechsel des lymphatischen Organs eingreift bleibt unbekannt. MÜSEBECK, BOOZ und MOOTZ (1966) nehmen an, daß in der Gaumenmandel die Focuswirkung mit Serotoninentgleisungen einhergeht, was nach den Befunden vorliegender Arbeit auch für die Rachenmandel zutreffen könnte.

Zusammenfassung

Mit den spezifischen fluoreszenzmikroskopischen Nachweismethoden für Histamin nach SHELLY, ÖHMAN und PARNES (1968) und Serotonin nach FALCK und HILLARP (1963) können die beiden biogenen Amine erstmalig in der menschlichen Rachenmandel in ihren Zelldepots histochemisch nachgewiesen werden. Das Histamin wird dabei in den Mastzellen, das Serotonin in den 5-HT-Zellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Die 5-HT-Zellen können von uns in keinem Fall als Mastzellen identifiziert werden. Unsere Beobachtungen ergeben auch keinen Anhalt für einen Serotoningehalt der Mastzellen in der menschlichen Rachenmandel.

Beide Zelltypen zeigen eine ähnliche Verteilung, wobei eine Übereinstimmung mit der Gaumenmandel deutlich ist. Sie finden sich mit intensiver Gelbfluoreszenz subepithelial, in den Trabekeln, perifollikulär und in der Kapsel. In den Sekundärfollikel lassen sich einzelne 5-HT-Zellen nachweisen, Der Histaminnachweis ist dort jedoch stets negativ ausgefallen.

Die angewandte Nachweismethode des Serotonins erlaubt lediglich Aussagen über die Verteilung, aber nicht über die Funktion des Serotonins in der menschlichen Rachenmandel. In der Diskussion der Ergebnisse wird auf die mögliche Bedeutung des Histamins in der menschlichen Rachenmandel mit Literaturhinweisen eingegangen.

Literaturverzeichnis

ALLEN, A.M. : Mitosis and binucleation in mast cells of rat. J.nat.Cancer Ind. 28, 1125-1151 (1962).

ASBOE-HANSEN, G.: The intercellular substance of the connective tissue in myxedema. J.invest.Derm. 15, 25 (1950).

BENDITT, E.P., R.L.WONG, M.ARASE and E.ROEPER : 5-Hydroxytryptamine in mast cells. Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 90, 303-304 (1955

BENSLEY, S. : On the origin of mast cells. Anat.Rec. 112, 310 (1952).

BIRT, A.R., P.HAGEN and E.ZEBROWSKI : Amino acid decarboxylase of urticaria pigmentosa mast cells. J.invest.Derm. 37, 273-276 (1961).

BOOZ, K.H. : Histochemische Untersuchungen zum Serotoninstoffwechsel in den Mastzellen der weißen Ratte. Med.-Habilitationsschrift Homburg/Saarbrücken 1967.

BOOZ, K.H., W.MOOTZ und K.MÜSEBECK : Über ein serotoninspeicherndes Zellsystem im Lymphknoten der weißen Ratte. Acta histochem.(Jena) 26, 237-243 (1967).

CORRODI, H. und N.A.HILLARP : Fluoreszenzmethoden zur histochemischen Sichtbarmachung von Monoaminen. 1. Identifizierung der fluoreszierenden Produkte aus Modellversuchen mit 6,7 Dimethoxyisochinolinderivaten und Formaldehyd. Helv.chim.Acta 46, 2425 (1963).

CORRODI, H. und N.A.HILLARP : Fluoreszenzmethoden zur histochemischen Sichtbarmachung von Monoaminen. 2. Identifizierung des fluoreszierenden Produktes aus Dopamin und Formaldehyd. Helv.chim.Acta 47, 911 (1964).

CORRODI, H. and G.JONSSON : The formaldehyde fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. A review on the methodology. J.Histochem.Cytochem. 15, 65 (1967).

CRAWFORD, N. and B.T.RUDD : A spektrophotofluorimetric method for the determination of serotonin (5-hydroxytryptamine) in plasma. Clin.chim.Acta 7, 114 (1962).

DAHLSTRÖM, A., J.HÄGGENDAL and T.HÖKEFELT : The noradrenaline content of the varicosities of sympathetic adrenergic nerve terminals in the rat. Acta physiol.scand. 67, 289 (1966).

DRABE, J. : Über das Vorkommen und die Bedeutung der Gewebsmastzellen in menschlichen Gaumenmandeln. Arch.Ohr-,Nas.-u.Kehlk.-Heilk. 177, 174-186 (1961).

EHRLICH, P. : Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbun und ihre Verwendung in der mikroskopis Technik. Arch.mikr.Anat. 13, 263-277 (1877).

EHRLICH, P. : Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. Arch.Anat.Physiol.LPZ. 3, 166-169 (187

FALCK, B. : Observations on the possibilities of t cellular localization of monoamines by a fluorescence method. Acta physiol.scand. 56, Suppl.197 (196

FALCK, B., N.A.HILLARP, G.THIEME and A.TORP : Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J.Histochem.Cytochem. 10, 348 (1963).

GASTPAR, H. und W.LORENZ : Speicherung, Bildung und Umsatz von Histamin in Speicheldrüsen und Tonsillen. Arch.klin.exp.Ohr-,Nas.-u.Kehlk.-Heilk. 191, 715-719 (1968).

GUSEK, W. : Zur Ultrastruktur und Genese von Mastzellen und Mastzellgranula. Habilitationsschrift Hamburg. Arch.klin.exp.Derm. 213, 573 (1960).

HESS, S.M. and S.UDENFRIEND : A fluorometric procedure for the measurement of tryptamine in tissues. J.Pharmacol.exp.Ther. 127, 175 (1959).

HILLARP, N.A. A.CARLSSON : zit. bei H.CORRODI und G.JONSSON (1967).

HÜBERS, H. : Fluoreszenzmikroskopischer Histaminnachweis in den Mastzellen der menschlichen Tonsilla palatina. Med.Diss.Homburg 1970.

JORPES, J.E., H.HOLMGREN und O.WILANDER : Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen. Z.mikr.-anat.Forsch. 42, 279-300 (1937).

JUHLIN, L. and W.B.SHELLY : Detection of histamine by a new fluorescent o-Phthalaldehyde stain. J.Histochem.Cytochem. 14, 525-528 (1966).

KAHLSON, G. : (1962) zit.bei A.E.SCHAUER (1964).

KELLER, R. : Zur Bindung von Histamin und Serotonin in den Mastzellen.
Arzneimittel-Forsch. 8, 390-394 (1958)

KELLER, R. : Bedeutung der Gewebsmastzelle im Entzündungsvorgang.
Med.Klin. 62, 1453-1457 (1967).

KORN, E.D. : The synthesis of heparin by slices of mouse mast cell tumor.
J.biol.Chem. 234, 1321 (1959).

LAGUNOFF, D., M.PHILIPPS and P.BENDITT : The histochemical demonstration of histamine in mastcells.
J.Histochem.Cytochem. 9, 534-541 (1961

LINDNER, J. : Die Mastzelle.
Ein Diskussionsbeitrag.
Mastzellen Symposion, Berlin, Mai 1960
Arch.klin.exp.Derm. 213, 588-606, 1961

LISON, L.A.J. : Histochimie des mastocytes.
In: Histamine and Anti-Histaminics.
Springer, Berlin (1966).

LORENZ, W., St.HEITLAND, E.WERLE, A.SCHAUER und H.GASTPAR : Histamin in Speicheldrüsen, Tonsillen, Thymus und adaptive Histaminbildung in der Glandula submandibularis. Neunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak. 259, 319-328 (1968).

MAGNUSSON, S. and B.LARSSON : Uptake of S^{35} labelled sulfate in the heparin of a dog mastocytoma. Acta chem. scand. 9, 534 (1955).

MEYER ZUM GOTTESBERGE, A. : Die Tonsille als lymphozytäres Organ. Acta oto-laryng. (Stockh.) 63, 229-237 (1967).

MICHELS, N.A. : The mast cells. Handbook of hematology. Paul B.Hoeber, New York. Vol.I, 232-372 (1937).

MISKOLCZY-FODOR : Über Mastzellen in Tonsillen unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Pract.oto-rhino-laryng. (Basel) 12, 44-56 (1950).

MÜSEBECK, K., K.H.BOOZ und W.MOOTZ : Über serotoninhaltige Zellen in der Tonsille des Menschen. Arch.klin.exp.Ohr-,Nas.-u.Kehlk.-Heilk. 187, 773-784 (1966).

NIEBAUER, G. : Morphologie, Histologie und Funktion Blut- und Gewebsmastzellen. Blut 16, 267-273 (1968).

PSAKHIS, B.J. : The state of mast cells of the naso-pharyngeal tonsil in its hypertrophy an chronic inflammation. Zbl.HNO-Heilk. 96, 200-201 (1968).

RILEY, J.F. and G.B.WEST : The presence of histamine in tissue mast cells. J.Physiol.(London) 120, 528-537 (1953)

RILEY, J.F. : The mast cells. Livingstone, Edinburgh 1959.

SCHAUER, A. : Die Mastzelle. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1964

SCHAUER, A. und M.EDER : Die Entwicklung von Mucopolysaccharide und Bildung histochemisch nachweisbare Enzyme während der Mastzellreifung. Virchows Arch.path.Anat. 335, 72 (1962

SCHAUER, A.E. und E.WERLE : Zur histochemischen Darstellung des Histamins der Mastzellen. Z.ges.exp.Med. 131, 100-104 (1959).

SCHAYER, R.W. : In: Histamine. ed.by G.E.W.Wolstenholme and C.M.O'Connor, Boston (1956).

SCHAYER, R.W. : Relationship of induced histidindecarboxylase from activity and histamine synthesis to shock from stress and from endotoxin.
Amer.J.Physiol. 198, 1187 (1960).

SELYE, H. : The mast cells.
London, Butterworth & Co., (1965).

SHELLY, W.B., S.ÖHMAN and M.PARNES : Mastcell stain for histamin in freeze-dried embedded tissue.
J.Histochem.Cytochem. 16, 433-439 (1968).

SHORE, P.A., A.BURKHALTER and V.H.COHN : A method for the fluorometric assay of histamine in tissues.
J.Pharmacol.exp.Ther. 127, 182-186 (1959).

STÄMLLER, M. : Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung der histiogenen Mastzellen im menschlichen Körper unter normalen und pathologischen Verhältnissen.
Frankf.Z.Path. 25, 391-435 (1921).

SYLVEN, B. : Über das Vorkommen von hochmolekularen Esterschwefelsäuren im Granulationsgewebe und bei der Epithelregeneration.
Acta chir.scand. 86, Suppl.66 (1941).

WEISSBACH, H., W.LOVENBURG and S.UDENFRIEND : Charakteristics of mammalian histidine decarboxylating enzymes. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 50, 177 (1961).

WERLE, E. und R.AMANN : Über eine Bindung des Histamins an Heparin. Naturwissenschaften 21, 583 (1955).

WERLE, E. und A.E.SCHAUER : 1955, zit. bei A.E.SCHAUER, 1964.

WILCKE, J. : Über den papierchromatographischen Nachweis des Histamingehaltes der Rachenmandel. Z.Laryng.Rhinol. 48, 707-710 (1969).

Herrn Professor Dr.med.Dr.med.dent.K.MÜSEBECK möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Ausarbeitung meiner Dissertation danken.
Mein aufrichtigster Dank gilt weiterhin Herrn Dr.W.MOOTZ, der mich mit den Grundlagen der histologischen Technik vertraut machte und mir jederzeit mit Rat und Tat behilflich war.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 19. Sept. 1946 in Kaiserslautern als Sohn des prakt. Arztes Dr.med.W.Christ und seiner Ehefrau Hilde.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Kaiserslautern, anschließend das Staatliche Altsprachliche Gymnasium in Kaiserslautern, wo ich im März 1966 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1966 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität in Mainz. Dort bestand ich im Herbst 1968 die ärztliche Vorprüfung.

Nach zwei Auslandssemestern an den Medizinischen Fakultäten der Universitäten in Innsbruck bzw. in Wien setzte ich mein Studium an der Universität des Saarlandes in Homburg fort und legte dort im November 1971 die ärztliche Prüfung ab.